

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 2 月 7 日 (07.02.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/10349 A1

(51) 国際特許分類:	C12N 5/06, 5/08, A61L 27/38	(JP) 単田 愛 (KUSHIDA, Ai) [JP/JP]; 〒162-0063 東京都新宿区山谷藤王寺町70-204 Tokyo (JP), 今野智恵 (KONNO, Chie) [JP/JP]; 〒120-0003 東京都足立区東和3-12-34-II-104 Tokyo (JP), 菊池明彦 (KIKUCHI, Akihiko) [JP/JP]; 〒177-0051 東京都練馬区関町北1-10-17 Tokyo (JP).
(21) 国際出願番号:	PCT/JP01/05723	
(22) 国際出願日:	2001 年 7 月 2 日 (02.07.2001)	
(25) 国際出願の言語:	日本語	(74) 代理人: 社本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大塚町二丁目2番1号 新大塚ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
(26) 国際公開の言語:	日本語	(81) 指定国 (国内): JP, US.
(30) 優先権データ:	特願2000-221383 2000 年 7 月 21 日 (21.07.2000) JP	(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
(71) 出願人 および		
(72) 発明者: 岡野光夫 (OKANO, Teruo) [JP/JP]; 〒272-0827 千葉県市川市国府台 6-12-12 Chiba (JP).		

添付公開書類:

国際調査報告書

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大和雅之 (YAMATO, Masayuki) [JP/JP]; 〒158-0097 東京都世田谷区用賀 2-28-16 Tokyo (JP), 内海義香 (UTSUMI, Mika) [JP/JP]; 〒279-0021 千葉県浦安市重田 3-3-A-1002 Chiba

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。



(54) Title: CULTURED EPIDERMAL CELL SHEET, LAMINATED CULTURED SKIN SHEET AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 表皮培養細胞シート、重層化培養皮膚シート及びそれらの製造法

(57) Abstract: A cultured epidermal cell sheet or a laminated cultured skin sheet is produced by culturing cells on a cell culture support which comprises a base material coated with a temperature-responsive polymer having an upper or lower critical temperature of dissolution in water of from 0 to 80°C, laminating the cultured cell layers if necessary, and then (1) adjusting the temperature of the liquid culture medium to a level higher than the upper critical dissolution temperature or lower than the lower critical dissolution temperature; (2) closely adhering the cultured epidermal cell sheet or the laminated skin sheet to a polymer film; and (3) peeling off as such together with the polymer film. Because of not decomposing F-cadherin or laminin 5 as in the case of treating with dispase and suffering from little structural defects, the cultured epidermal cell sheet and laminated cultured skin sheet thus obtained are strongly expected as being applicable to clinical operations such as skin transplantation.

[続要素]



(57) 要約:

水に対する上限もしくは下限臨界溶解温度が 0 ～ 8 0℃である温度応答性ポリマーで基材表面を被覆した細胞培養支持体上で細胞を培養し、必要により培養細胞層を重層化させ、その後

- (1) 培養液温度を上限臨界溶解温度以上または下限臨界溶解温度以下とし、
- (2) 培養した表皮細胞シートまたは重層化皮膚シートを高分子膜に密着させ、及び
- (3) そのまま高分子膜と共に剥離する

ことによって表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シートを製造する。このようにして得られた表皮培養細胞シート及び重層化培養皮膚シートは、ディスプレイ処理における場合のように E-カドヘリン、ラミニン 5 を分解することがなく、しかも構造欠陥が極めて少ないため、皮膚移植等の臨床応用が強く期待される。

明 細 書

表皮培養細胞シート、重層化培養皮膚シート、及びそれらの製造法

技術分野

5 本発明は、生物学、医学等の分野における表皮培養細胞シート、重層化培養皮膚シート、それらの製造法及びそれらを利用した治療法に関する。

背景技術

火傷等の皮膚損傷が生じた場合、最も留意すべきことは火傷等により損傷した皮膚からの細菌感染である。特に、死滅した皮膚部は雑菌が多量に繁殖しやすい。そのため、かかる死滅した皮膚部は除去して雑菌が繁殖しないようにしておく必要がある。しかし、皮膚を除去すると、そこから細菌感染を引き起こす。このような細菌感染を防止するには、皮膚が除去された部分を適当な材料でマスキングを施して細菌の侵入を避ける必要がある。この目的で使用されるマスキング材としては、合成高分子材料及び培養皮膚が挙げられる。しかし、合成高分子は拒絶反応等が生じる可能性があり、移植用皮膚としては好ましくない。一方、培養皮膚は本人の正常な皮膚の一分を所望の大きさまで培養したものであるため、これを使用して拒絶反応等の心配がなく、最も自然なマスキング剤と言える。

従来、そのような細胞培養は、ガラス表面上あるいは種々の処理を行った合成高分子の表面上にて行われていた。例えば、ポリスチレンを材料とする表面処理、例えば γ 線照射、シリコーンコーティング等を行った種々の容器等が細胞培養用容器として普及している。このような細胞培養用容器を用いて培養・増殖した細胞は、トリプシンのような蛋白分解酵素や化学薬品により処理することで容器表面から剥離・回収される。

25 しかし、上述のような化学薬品処理を施して増殖した細胞を回収する場合、処理工程が煩雑になり、不純物混入の可能性が多くなること、及び増殖した細胞が化学的処理により変成若しくは損傷し細胞本来の機能が損なわれる例があること等の欠点が指摘されていた。かかる欠点を克服するために、これまでいくつかの技術が提案されている。

特公平2-23191号公報には、ヒト新生児由来角化表皮細胞を、ケラチン組織の膜が容器の表面上に形成される条件下に、培養容器中で培養し、ケラチン組織の膜を酵素を用いて剥離させることを特徴とするケラチン組織の移植可能な膜を製造する方法、が記載されている。具体的には、3T3細胞をフィダーレイヤーとして増殖、重層化させ、蛋白質分解酵素であるディスパーゼを用いて細胞シートを回収する技術が開示されている。しかしながら、当該公報に記載されている方法は次のような欠点を有していた。

(1) ディスパーゼは菌由来のものであり、回収された細胞シートを十分に洗浄する必要性があること。

10 (2) 培養された細胞ごとにディスパーゼ処理の条件が異なり、その処理に熟練が必要であること。

(3) ディスパーゼ処理により培養された表皮細胞が病理学的に活性化されることが。

(4) ディスパーゼ処理により細胞外マトリックスが分解されること。

15 (5) そのためその細胞シートを移植された患部は感染され易いこと。

また、特開平05-192138号公報には、水に対する上限若しくは下限臨界溶解温度が $0\sim 80^{\circ}\text{C}$ であるポリマーで基材表面を被覆した細胞培養支持体上にて、皮膚細胞を上限臨界溶解温度以下または下限臨界溶解温度以上で培養し、その後上限臨界溶解温度以上または下限臨界溶解温度以下にすることにより培養皮膚細胞が剥離されることを特徴とする皮膚細胞培養法が記載されている。この方法においては、温度応答性ポリマーを被覆した培養基材から温度により細胞を剥離させているが、この方法では剥離性が悪く、得られた細胞シートは構造欠陥の多いものであった。

25 発明の開示

本発明は、上記のような従来技術の問題点を解決することを意図してなされたものである。すなわち、本発明は、細胞、細胞間のデスモソーム構造、及び細胞、基材間の基底膜様蛋白質が保持された状態で回収される構造欠陥の少ない表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シートを提供することを目的とする。また、

本発明は、ディスポーゼのような酵素で処理することなく環境温度を変化させるとともに高分子膜を用いることにより、培養・増殖させた細胞を容易にかつその形態を崩さずに支持体表面からの剥離・回収が可能となる方法を提供することを目的とする。

6 本発明者らは、上記課題を解決するために、種々の角度から検討を加えて、研究開発を行った。その結果、温度応答性ポリマーで基材表面を被覆した細胞培養支持体上で細胞を培養し、必要により培養細胞層を重層化させ、その後、培養液温度を上限臨界溶解温度以上または下限臨界溶解温度以下とし、培養した表皮細胞シートまたは重層化皮膚シートを高分子膜に密着させ、そのまま高分子膜と共に剥離することにより、構造欠陥の少ない表皮細胞シートまたは重層化皮膚シートが得られることを見いだした。本発明はかかる知見に基づいて完成されたものである。

すなわち、本発明は、細胞、細胞間のデスマソーム構造、及び細胞、基材間の基底膜様蛋白質が保持された状態で回収される構造欠陥の少ない表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シートを提供する。

また、本発明は、水に対する上限もしくは下限臨界溶解温度が0～80℃である温度応答性ポリマーで基材表面を被覆した細胞培養支持体上で細胞を培養し、必要に応じて常法により培養細胞層を重層化させ、その後

(1) 培養液温度を上限臨界溶解温度以上または下限臨界溶解温度以下とし、
(2) 培養した表皮細胞シートまたは重層化皮膚シートを高分子膜に密着させ、及び
(3) そのまま高分子膜と共に剥離すること

ことを特徴とする表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シートの製造法を提供する。

25 更に、本発明は、上記製造法で得られた高分子膜に密着した表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シートを再び細胞培養支持体、温度応答性ポリマーで表面を被覆した細胞培養支持体、高分子膜、或いは他の細胞シート等に付着させ、その後、密着した高分子膜を剥がす操作を繰り返すことで重層化させることを特徴とする重層化培養皮膚シートの製造法を提供する。

加えて、本発明は、皮膚組織の深部まで欠損した火傷及び／または創傷部に対する治療用の上記表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シートを提供する。更に加えて、本発明は、皮膚組織の深部まで欠損した火傷及び／または創傷部に対し、上記表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シートを移植することを特徴とする治療法を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、各条件下における重層化培養皮膚シートの形成状態を示す顕微鏡写真である。上段の写真は温度応答性ポリマーをグラフトしていない通常の培養皿上で培養した細胞の顕微鏡写真である。下段の写真はポリイソプロピルアクリルアミド(PIPAAm)をグラフトさせた培養皿上で培養した細胞の顕微鏡写真である。

図2は、ポリイソプロピルアクリルアミド(PIPAAm)をグラフトさせた培養皿上で培養した細胞の顕微鏡写真である。上段は、培養21日後にディスポーゼ処理を施した培養細胞をHE染色して得られた顕微鏡写真である。

図3は、温度応答性培養皿上の重層化培養皮膚シートを低温処理(20℃で30分インキュベート)、ディスポーゼ処理、物理的刺激(スクレーパーによる掻き取り)のいずれかで回収し、電気泳動法により細胞中の全蛋白質を定量的な結果を示す電気泳動法写真である。

図4は、温度応答性培養皿上の重層化表皮細胞層を低温処理(20℃で30分インキュベート)、ディスポーゼ処理、物理的刺激(スクレーパーによる掻き取り)のいずれかで回収し、抗E-カドヘリン抗体、抗ラミニン5抗体によるウエスタンブロッティングを用いて分析した結果を示す電気泳動法写真である。

図5は、低温処理によって得られた本発明の重層化培養皮膚シートをヌードラットに移植した結果を示す組織切片の顕微鏡写真である。

図6は、低温処理により得られた重層化培養皮膚シート及びディスポーゼ処理により得られた重層化培養皮膚シートをヌードラットに移植して得られた組織切片をアザン染色した顕微鏡写真である。

図7は、低温処理により得られた重層化培養皮膚シート及びディスポーゼ処理

により得られた重層化培養皮膚シートをスライドラットに移植して得られた組織切片を銀染色した顕微鏡写真である。

発明を実施するための最良の形態

5 本発明の表皮培養細胞シート及び重層化培養皮膚シートの作製に使用される好適な細胞として表皮細胞が挙げられる。その種類は、何ら制約されるものではない。例えば、表皮角化細胞、メラノサイト、立毛筋細胞、さらに毛包細胞等が挙げられるが、得られる細胞シートもしくは皮膚シートを医療目的に使用する場合、ヒト表皮角化細胞が望ましい。本発明において、表皮培養細胞シートとは、上記したように生体における表皮を形成する各種細胞が培養支持体上で単層状に培養され、その後、支持体よる剥離されたシートを意味し、重層化培養皮膚シートとは、その各種表皮培養細胞シートが単独若しくは組み合わされた状態で重層化されたシートを意味する。

10 本発明における表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シートは培養時にデイスパーゼ、トリプシン等で代表される蛋白質分解酵素に損傷を受けていないものである。そのため、基材から剥離された表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シートは、細胞、細胞間のデスモソーム構造が保持され、構造的欠陥が少なく、また強度の高いものである。このことは、例えば、得られた細胞シートまたは皮膚シートを移植等を目的に利用した場合、患部は本発明のシートにより外部と完全に隔離されることになり感染され難くなる。また、本発明のシートは培養時に形成される細胞、基材間の基底膜様蛋白質も酵素による破壊を受けていない。このことは、移植時において患部組織と良好に接合することができ、効率良い治療を実施することができるようになる。以上のことを具体的に説明すると、トリプシン等の通常の蛋白質分解酵素を使用した場合、細胞、細胞間のデスモソーム構造及び細胞、基材間の基底膜様蛋白質等は殆ど保持されておらず、従って、細胞は個々に分かれた状態となって剥離される。その中で、蛋白質分解酵素であるデイスパーゼに関しては、細胞、基材間の基底膜様蛋白質等を殆ど破壊してしま

25 うものの、デスモソーム構造については10～60％保持した状態で剥離させることができることで知られているが、得られる細胞シートは強度の弱いものである

る。これに対して、本発明の細胞シートは、デスモソーム構造、基底膜様蛋白質共に80％以上残存された状態のものであり、上述したような種々の効果を得ることができるものである。

5 本発明における表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シートは、以上に示すように、細胞、細胞間のデスモソーム構造、及び、細胞、基材間の基底膜様蛋白質双方を兼ね備え、しかも強度の高いシートであり、従来技術からでは全く得られなかったものである。

細胞培養支持体において基材の被覆に用いられる温度応答性ポリマーは、水溶液中で上限臨界溶解温度または下限臨界溶解温度0℃～80℃、より好ましくは20℃～50℃を有する。上限臨界溶解温度または下限臨界溶解温度が80℃を越えると細胞が死滅する可能性があるのが好ましくない。また、上限臨界溶解温度または下限臨界溶解温度が0℃より低いと一般に細胞増殖速度が極度に低下するか、または細胞が死滅してしまうため、やはり好ましくない。

10 本発明に用いる温度応答性ポリマーはホモポリマー、コポリマーのいずれであってもよい。このようなポリマーとしては、例えば、特開平2-211865号公報に記載されているポリマーが挙げられる。具体的には、例えば、以下のモノマーの単独重合または共重合によって得られる。使用し得るモノマーとしては、例えば、(メタ)アクリルアミド化合物、N- (若しくはN, N-ジ) アルキル置換(メタ)アクリルアミド誘導体、またはビニルエーテル誘導体が挙げられ、

20 コポリマーの場合は、これらの中で任意の2種以上を使用することができる。更には、上記モノマー以外のモノマー類との共重合、ポリマー同士のグラフトまたは共重合、あるいはポリマー、コポリマーの混合物を用いてもよい。また、ポリマー本来の性質を損なわない範囲で架橋することも可能である。

25 被覆を施される基材としては、通常細胞培養に用いられるガラス、改質ガラス、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等の化合物を初めとして、一般に形態付与が可能である物質、例えば、上記以外の高分子化合物、セラミックス類など全て用いることができる。

温度応答性ポリマーの支持体への被覆方法は、特に制限されないが、例えば、特開平2-211865号公報に記載されている方法に従ってよい。すなわち、

かかる被覆は、基材と上記モノマーまたはポリマーを、電子線照射（EB）、γ線照射、紫外線照射、プラズマ処理、コロナ処理、有機重合反応のいずれかにより、または塗布、混練等の物理的吸着等により行うことができる。

本発明において、細胞の培養は上述のようにして製造された細胞培養支持体上（例えば、細胞培養皿）で行われる。培地温度は、基材表面に被覆された前記ポリマーが上限臨界溶解温度を有する場合はその温度以下、また前記ポリマーが下限臨界溶解温度を有する場合はその温度以上であれば特に制限されない。しかし、培養細胞が増殖しないような低温域、あるいは培養細胞が死滅するような高温域における培養が不適切であることは言うまでもない。温度以外の培養条件は、常に従えばよく、特に制限されるものではない。例えば、使用する培地については、公知のウシ胎児血清（FCS）等の血清が添加されている培地でもよく、また、このような血清が添加されていない無血清培地でもよい。

本発明の方法においては、前記方法に従い、表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シートの使用目的に合わせて培養時間を設定すればよい。培養した細胞を支持体材料から剥離回収するには、培養された表皮細胞シート及び重層化皮膚シートを高分子膜に密着させ、細胞の付着した支持体材料の温度を支持体基材の被覆ポリマーの上限臨界溶解温度以上若しくは下限臨界溶解温度以下にすることによって、そのまま高分子膜とともに剥離することができる。なお、シートを剥離することは細胞を培養していた培養液において行うことも、その他の等張液において行うことも可能であり、目的に合わせて選択することができる。表皮細胞シート及び重層化皮膚シートを密着させる際に使用する高分子膜としては、例えば、ポリビニリデンフルオライド（PVDF）、ポリプロピレン、ポリエチレン、セルロース及びその誘導体、キチン、キトサン、コラーゲン、ウレタン等を挙げることができる。

本発明における重層化培養皮膚シートの製造法は特に限定されるものではないが、例えば、一般的に知られている3T3細胞をフィーダーレイヤーとして増殖、重層化させる方法、或いは上記の高分子膜に密着した表皮培養細胞シートを利用することで製造する方法等を挙げることができる。具体的には、次のような方法が例示される。

（1）高分子膜と密着した細胞シートを細胞培養支持体に付着させ、その後培地を加えることで高分子膜を細胞シートからはがし、そして更に別の高分子膜と密着した細胞シートを付着させることを繰り返すことで細胞シートを重層化させる方法。

（2）高分子膜と密着した細胞シートを反転させ細胞培養支持体上で高分子膜側で固定させ、細胞シート側に別の細胞シートを付着させ、その後培地を加えることで高分子膜を細胞シートからはがし、再び別の細胞シートを付着させる操作を繰り返すことで細胞シートを重層化させる方法。

（3）高分子膜と密着した細胞シート同士を細胞シート側で密着させる方法。

（4）高分子膜と密着した細胞シートを生体の患部に当て、細胞シートを生体組織に付着させた後、高分子膜をはがし、再び別の細胞シートを重ねていく方法。

本発明における重層化培養皮膚シートは、必ずしも表皮角化細胞だけからなるものでなくとも良い。例えば、表皮角化細胞からなる細胞シート或いは重層化皮膚シートに、同様に操作して作製した繊維芽細胞シート及び／または血管内皮細胞シートを重ね合わせることも可能である。生体内の皮膚組織により近いものとする上でこのような技術は極めて有効である。

表皮培養細胞シート及び重層化培養皮膚シートを高収率で剥離、回収する目的で、細胞培養支持体を軽くたたいたり、ゆらしたりする方法、更にはピペットを用いて培地を攪拌する方法等を単独で、あるいは併用して用いてもよい。加えて、必要に応じて培養細胞は等張液等で洗浄して剥離回収してもよい。

上述の方法により得られた表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シートは、従来の方法により得られたものに比べて、剥離性の点でも非侵襲性の点でも極めて優れており、移植用皮膚等の臨床応用が強く期待される。特に、本発明の重層化培養皮膚シートは従来の培養皮膚シートとは異なり、基底膜様蛋白質をほじっているため、皮膚移植の際に患部組織を深く削っても、生着する。このことは、患部の治療効率の向上、更には患者の負担の軽減もはかられ極めて有効な技術と考えられる。更に、本発明の細胞培養法は、表皮角化細胞に限らず、例えば、腎細胞、肺細胞、粘膜、或いは消化器系の種々の臓器等の上皮細胞に対しても有効な技術である。なお、本発明の方法において使用される細胞培養支持体は繰り返し

し使用が可能である。

実施例

以下に、本発明を実施例に基づいて更に詳しく説明するが、これらは本発明を何ら限定するものではない。

実施例 1：温度応答性培養皿上で培養・重層化させたヒト角化表皮細胞シート of

脱着・回収：

材料

材料として以下のものを使用した。

・細胞：ヒト新生児由来角化表皮細胞（三光純薬 CC-2503）、NIH3T3細胞。

・培養皿：温度応答性培養皿 H003（1.9 μg/cm²）、対照としてフアルコン 3001。

・培地：DMEM+AB（フィードーレイヤー作製用）、グリーンらの培地（ヒト新生児由来角化表皮細胞用）。

・マイトマイシン C（和光純薬）。

・デイスパーゼ（合同酒精）。

・デュラポアメンブレン（親水化 PVDF 膜、型番 SULP04700、MILLIPORE 製）。

方法

NIH3T3細胞を直径 35mm の培養皿（3001、H003）に 2×10⁴ cells/cm² の細胞密度で播種し、接着・伸展後、16 μg/mL マイトマイシン C 入の無血清培地に交換し、2 時間処理し、ヒト新生児由来角化表皮細胞を 5×10⁴ cells/dish で播種した。

3 週間後、H003 上の細胞を以下に記載するように、デイスパーゼ（合同酒精）30 units/cm² で処理し、または低温処理して脱着した。フアルコン 3001 上の細胞はデイスパーゼ（合同酒精）30 units/cm² で処理して脱着した。

【デイスパーゼ処理】

培地を吸引した後に、直径 35mm の培養皿に合うように切ったデュラポアメンブレンを細胞層上にのせ、1mL ずつ加える。室温に 30 分置き、培地をアスピレートしてから細胞シートをメンブレンと共に脱着した。

5 【低温処理】

培地を吸引した後に、直径 35mm の培養皿に合うように切ったデュラポアメンブレンを細胞層上にのせ、20℃で 30 分インキュベーションした。その後、ピンセットを用いて細胞シートがメンブレンにのるように脱着した。

【組織切片】

10 メンブレンに脱着した細胞をのせたまま培養皿に移し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。脱水は 70%、80%、90%エタノール中に各々 10 分づつ静置した後、100%エタノール中にて約 1 時間静置し、最後にアルコールをクロホルムに置換するため、クロホルム中で 30 分間静置することを 3 回繰り返した。61℃で溶かして置いたパラフィンを流し込み、パラフィンが試料を完全に包み込むまで 61℃でインキュベートした後、室温でパラフィンを固化させた。薄切後、HE 染色し、顕微鏡下で観察した。

結果

結果を図 1～図 7 に示す。

図 1 は、各条件下における重層化培養細胞シートの形成状態を示す顕微鏡写真である。図中、ungrafted PST は温度応答性ポリマーで被覆されていない細胞培養用ポリスチレン皿を用いて培養したことを示し、PIPAAm-grafted はポリイソプロピルアクリルアミド (PIPAAm) をグラフトさせた培養皿上で培養したことを示す。21-day cultured は 21 日間培養したことを意味する。disperse はデイスパーゼで処理したことを意味する。reduced temp. は低温処理したことを意味する。bar=100 μm とは、a～j の各々における棒（白抜きまたは黒抜き）の長さが 100 μm であることを意味する。

上段の写真 a～e は温度応答性ポリマーをグラフトしていない通常のデイスパーゼで培養した細胞の顕微鏡写真である。倍率は写真中の bar（バー）の長さ

によって表示した。a、bは21日間培養した細胞の増殖度を表す。aは低倍率の、bは高倍率の顕微鏡写真である。cは培養21日後にデイスパーゼ処理を施した培養細胞である。d、eは培養21日後に20℃で30分インキュベートした細胞である。dは低倍率の、eは高倍率の顕微鏡写真である。下段の写真f～jはポリイソプロピルアクリルアミド(PIPAAm)をグラフトさせた培養皿上で培養した細胞の顕微鏡写真である。f、gは21日間培養した細胞の増殖度を表す。fは低倍率の、gは高倍率の顕微鏡写真である。hは培養21日後にデイスパーゼ処理を施した培養細胞である。i、jは培養21日後に20℃で30分インキュベートした細胞である。iは低倍率の、jは高倍率の顕微鏡写真である。

図1に示した結果から次のことが判った。ポリイソプロピルアクリルアミドグラフトさせた培養皿上(下段)においても、通常の培養皿上(上段)と同様に細胞を培養でき、しかも温度を下げるだけで細胞シートとして剥離させられる。通常の培養皿からではシート状細胞は回収できない。

図2は、ポリイソプロピルアクリルアミド(PIPAAm)をグラフトさせた培養皿上で培養した細胞の顕微鏡写真である。図中、dispassはデイスパーゼで処理したことを意味する。low temp.は低温処理したことを意味する。

図2の上段は、培養21日後にデイスパーゼ処理を施した培養細胞をHE染色して得られた顕微鏡写真である。下段は、培養21日後に20℃で30分インキュベートした細胞をHE染色して得られた顕微鏡写真である。図中の黒い部分が染色された部分である。dispassはデイスパーゼで処理したことを意味する。reduced temp.は低温処理したことを意味する。

図2に示したことから次のことが判った。低温処理により得られた細胞シート(下段)においては、細胞、細胞間の蛋白質が染色されている(図中の黒い部分)。また、デイスパーゼ処理により得られた細胞シート(上段)においては、細胞、細胞間に染色されている部分がなく(図中に黒い部分がない。)、即ちこれは得られた培養皮膚シートに細胞-細胞間の蛋白質は消失していることを意味する。

図3は、上記実施例1によって得られた温度応答性培養皿上の重層化表皮細胞層を低温処理(20℃で30分インキュベート)、デイスパーゼ処理、物理的刺激(スクレーパーによる掻き取り)のいずれかで回収し、電気泳動法により細胞表面蛋白質を定量化した結果を示す電気泳動法写真である。図中、66Kは血清アルブミンを、116Kはβ-ガラクトシダーゼを、200Kはミオシンを意味する。また、PStは温度応答性ポリマーを被覆していない細胞培養用のポリスチレン皿を意味する。PIPAAmはポリイソプロピルアクリルアミドで被覆したポリスチレン皿を意味する。Dはデイスパーゼ処理して回収した細胞層、Sは物理的刺激により回収した細胞層、Tは低温処理して回収した細胞層をそれぞれ意味する。これらの結果は、いずれの培養皿、更にはいずれの剥離法においても細胞に存在する蛋白質の種類、量は変化していないことを示している。

図4は、上記実施例1によって得られた温度応答性培養皿上の重層化表皮細胞層を低温処理(20℃で30分インキュベート)、デイスパーゼ処理、物理的刺激(スクレーパーによる掻き取り)のいずれかで回収し、抗E-カドヘリン抗体、抗ラミニン5抗体(図中ではLaminin 5(γ2)と記載されている)によるウエスタンブロッティングを用いて分析した結果を示す。図中、PSt、PIPAAm、D、S、Tは図3と同じ意味を表す。また、E-cadherinと記載されている図は、抗E-カドヘリン抗体を用いた場合の結果を、Laminin 5(γ2)と記載されている図は、抗ラミニン5抗体を用いた場合の結果の結合をそれぞれ表す。120Kは、細胞、細胞間に存在することで知られるE-カドヘリン(E-cadherin)を、150K及び105Kは、細胞、細胞間に存在するラミニン5(Laminin 5(γ2))をそれぞれ意味する。これらの結果から次のことが判った。

(1) 通常の培養皿(ポリスチレン)

D(デイスパーゼ処理)は蛋白質が喪失される。S(スクレーパーによる掻き取り)は蛋白質は保持されるものの、細胞を基材から無理やり剥がすため、構造欠陥の多い細胞シートとなる。

(2) ポリイソプロピルアクリルアミドをグラフトさせた培養皿

D(デイスパーゼ処理)は蛋白質が喪失される。S(スクレーパーによる掻き

養皮膚シートは実施例 1 と同様に低温処理を施すことにより支持体表面から剥離した。実施例 1 と同様に、ヌードラットに移植し、実施例 1 で得られた重層化培養皮膚シートと比較検討した。結果を表 1 に示す。

5 表 1

皮膚シート	シート強度	移植結果 生着速度	生着性
実施例 1 で得られた皮膚シート	○	○	○
実施例 2 で得られた皮膚シート	○	◎	○

(注) ◎は極めて優れていることを、○は優れていることを表す。

10 以上の結果から、実施例 2 で得られた重層化培養皮膚シートもラット組織に良く生着することが判る。更に、本シートであれば、その生着するに必要な時間が短縮しうることも判った。

15 なお、上記各実施例において、「低温処理」は 20℃で 30 分インキュベートという条件下で行われたが、本発明において「低温処理」はこれらの温度及び時間に限定されない。本発明における「低温処理」として好ましい温度条件は 0℃～30℃であり、好ましい処理時間は 2 分～1 時間である。

実施例 3

20 本発明の重層化培養皮膚シートを用い、顔面部火傷治療後の瘢痕部の治療を患者本人の同意のもとで実施した。具体的には、患者の上腕部から 1cm×1cm の大きさの表皮細胞膜を採取した。このものを常法に従いトリプシン処理を行い、個々の細胞とし、その後は実施例 1 に示す方法で、ポリソプロピルアクリルアミドが被覆された培養皿 (H003) 並びに、対照として、通常の培養皿 (ファルコン 3001) を利用して培養を行った。3 週間後、前者の H003 基材上の重層化培養皮膚シートは低温処理により、後者の基材上の皮膚シートはディスバ

取り) は蛋白質は保持されるものの、細胞を基材から無理やり剥がすため、構造欠陥の多い細胞シートとなる。これに対して、T (低温処理、本発明の方法) は、蛋白質が保持され、かつ構造欠陥の少ない細胞シートが得られる。

図 5 は、上記実施例 1 における低温処理によって得られた本発明の重層化培養皮膚シートをヌードラット (F344nu/nu (無胸腺ラット)、雄、4 週齢) に移植した結果を示す顕微鏡写真である。図中の b が重層化培養皮膚シート、図中の c がラットの組織である。図中の a は培養皮膚シートが生着し、その結果として生じた角化層である。

図 5 から、移植された本発明の重層化培養皮膚シートはラットの組織に良く生着している (すなわち、b と c の境部が肥大化していない上、剥離していない。)

図 6 及び図 7 は、上記組織切片をそれぞれアザン染色及び鍍銀染色した結果である。図 6 及び図 7 において、a が移植された重層化培養皮膚シート、c がラットの組織である。低温処理により得られた重層化培養皮膚シートはラットの組織に良く生着しているが、ディスバース処理により得られたものでは、a と c の間の基底膜層がディスバースにより断絶されていること (d)、及び a と c の間の空隙 (b) が見られることから、移植された皮膚シートは、基底膜が断絶され、その結果、生体組織に十分に生着できていないことが分かる。

20 実施例 2

ヒト繊維芽細胞 (クラボウ株式会社製) を、ポリソプロピルアミド (PIPAAm) をグラフト化 (1.9μg/cm²) させた直径 35mm の培養皿上に 2×10⁴cells/cm² の細胞密度で播種し、常法に従って培養した (使用培地: ウシ血清 20% 含 DMEM)。5 日後、ヒト繊維芽細胞がコンフルエントになったことを確認した後、培地を吸引した。直ちに実施例 1 で PIPPAm をグラフト化した培養皿から低温処理して得られた高分子膜に密着した重層化培養皮膚シートを重ね合わせ、その後、実施例 1 で用いた培地を静かに入れ、密着した高分子膜を剥がした。この状態で 2 日間培養することで、繊維芽細胞シートと重層化培養皮膚シートとを付着させた。得られた繊維芽細胞層を有する重層化培

一ゼ処理により剥離させた。

一方、患者の癒痕部を通常の深さで削ったところへ、一部それより深く削ったところを準備した。2段階で削った創傷部に対し、上で得られたそれぞれの皮膚シートを移植し、移植後1週間の経過を観察した。結果を表2に示す。

5

表 2

	創傷深さ	浅い	深い
低温処理して得られた皮膚シートの生着性	◎	○	○
ディスパーゼ処理して得られた皮膚シートの生着性	○	○	×

(注) ◎は極めて優れていることを、○は優れていることを、×は劣ることを表す。

以上の結果より、癒痕治療において、従来、ディスパーゼ処理によって回収した重層化培養皮膚シートでは生着しないような深部まで削られた創傷部でも本発明の皮膚シートであれば良好に生着することが分かった。このことは、治療の効率化による患者の負担軽減、また、癒痕部を深く削るため移植後の整形効果の向上につながり、極めて有効な技術と考えられる。

産業上の利用の可能性

本発明の表皮培養細胞シート及び重層化培養皮膚シートは、ディスパーゼ処理における場合のようにE-カドヘリン、ラミニン5を分解することがなく、しかも構造欠陥が極めて少ないため、皮膚移植等の臨床応用が強く期待される。したがって、本発明は細胞工学、医用工学、などの医学、生物学等の分野における極めて有用な発明である。

請 求 の 範 囲

1. 細胞、細胞間のデスモソーム構造、及び細胞、基材間の基底膜糖蛋白質が保持された状態で回収される構造欠陥の少ない表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シート。

2. 蛋白質分解酵素による処理を施されることなく基材から剥離された、請求項1記載の表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シート。

3. 繊維芽細胞シート及び/または血管内皮細胞シートが重ね合わされていることを特徴とする請求項1または2記載の表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シート。

4. 水に対する上限もしくは下限臨界溶解温度が0～80℃である温度応答性ポリマーで基材表面を被覆した細胞培養支持体上で細胞を培養し、必要に応じて常法により培養細胞層を重層化させ、その後

(1) 培養液温度を上限臨界溶解温度以上または下限臨界溶解温度以下とし、
(2) 培養した表皮細胞シートまたは重層化皮膚シートを高分子膜に密着させ、及び
(3) そのまま高分子膜と共に剥離する

ことを特徴とする表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シートの製造法。

5. 請求項4で得られた高分子膜に密着した表皮培養細胞シートを再び細胞培養支持体、温度応答性ポリマーで表面を被覆した細胞培養支持体、高分子膜、或いは細胞シート等に付着させ、その後、密着した高分子膜を剥がす操作を繰り返すことで重層化させることを特徴とする重層化培養皮膚シートの製造法。

6. 剥離が蛋白質分解酵素による処理が施されていない、請求項4または5記載の表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シートの製造法。

7. 温度応答性ポリマーが、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)である、請求項4または5記載の表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シートの製造法。

8. 高分子膜が、親水化処理が施されたポリビニルピロリドンフィルムである、請求項4または5記載の表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シートの製造

法。

9. 他の細胞シートが、表皮培養シート、重層化培養皮膚シート、並びに請求項4記載の製造法で作製した繊維芽細胞シート及び血管内皮細胞シートの中の1種もしくは2種以上のものからなる、請求項5記載の重層化培養皮膚シートの製造法。

10. 請求項4ないし9のいずれか1項記載の方法により製造される表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シート。

11. 皮膚組織の深部まで欠損した火傷及び/または創傷部に対する治療用の請求項1-3及び10のいずれか1項記載の表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シート。

12. 皮膚組織の深部まで欠損した火傷及び/または創傷部に対し、請求項1-3及び10のいずれか1項記載の表皮培養細胞シートまたは重層化培養皮膚シートを移植することを特徴とする治療法。

図1

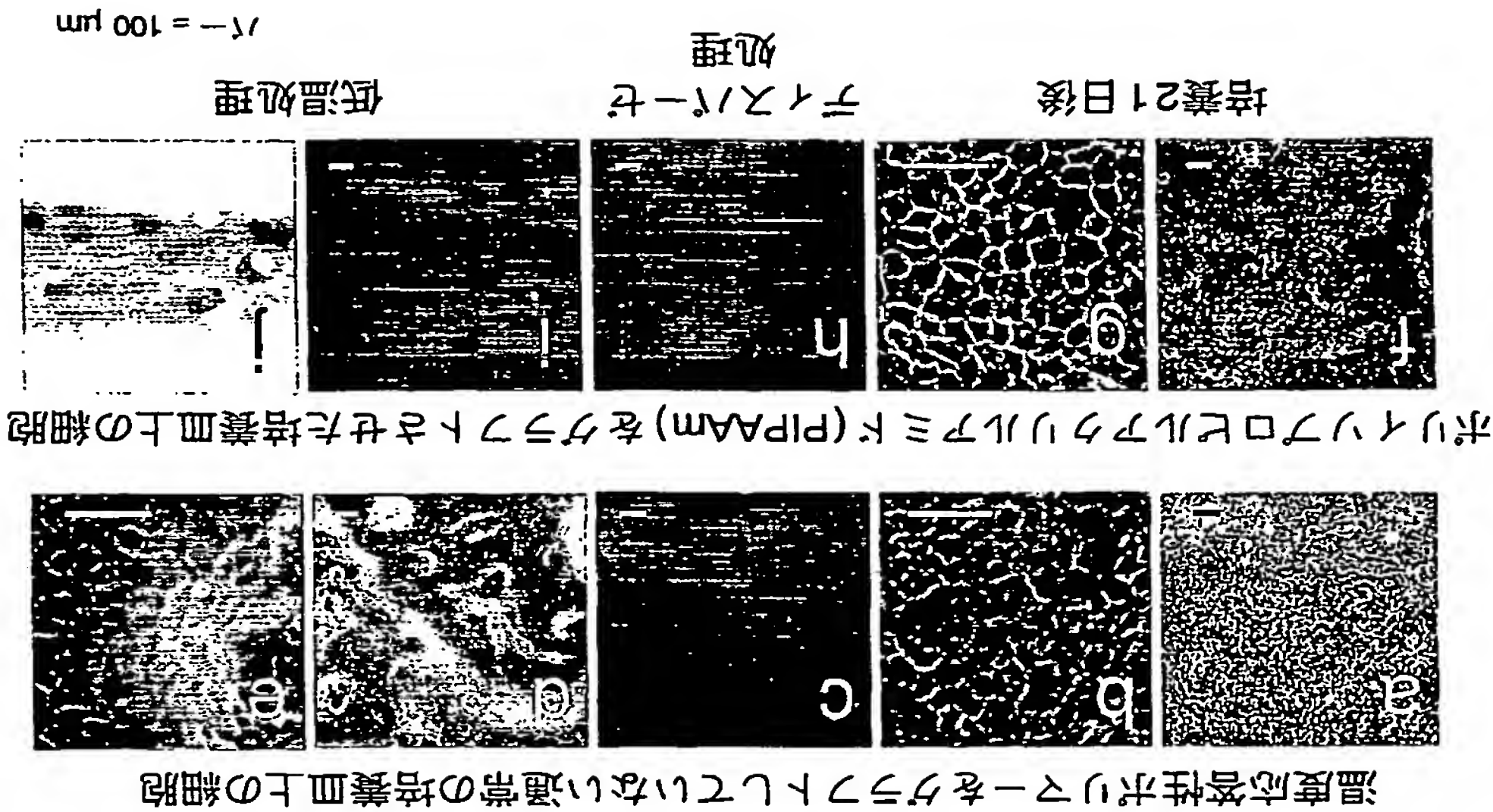


図2

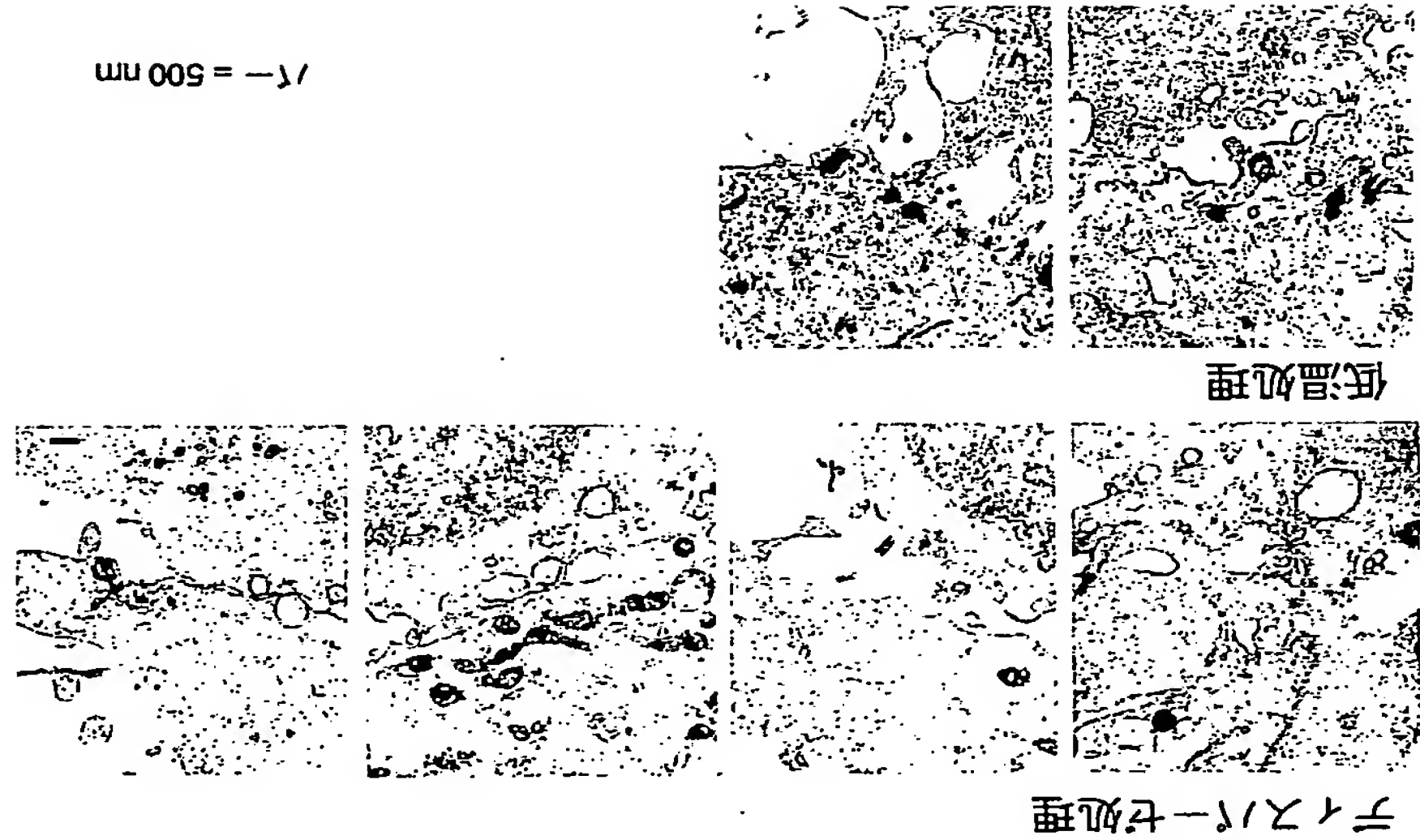


図3

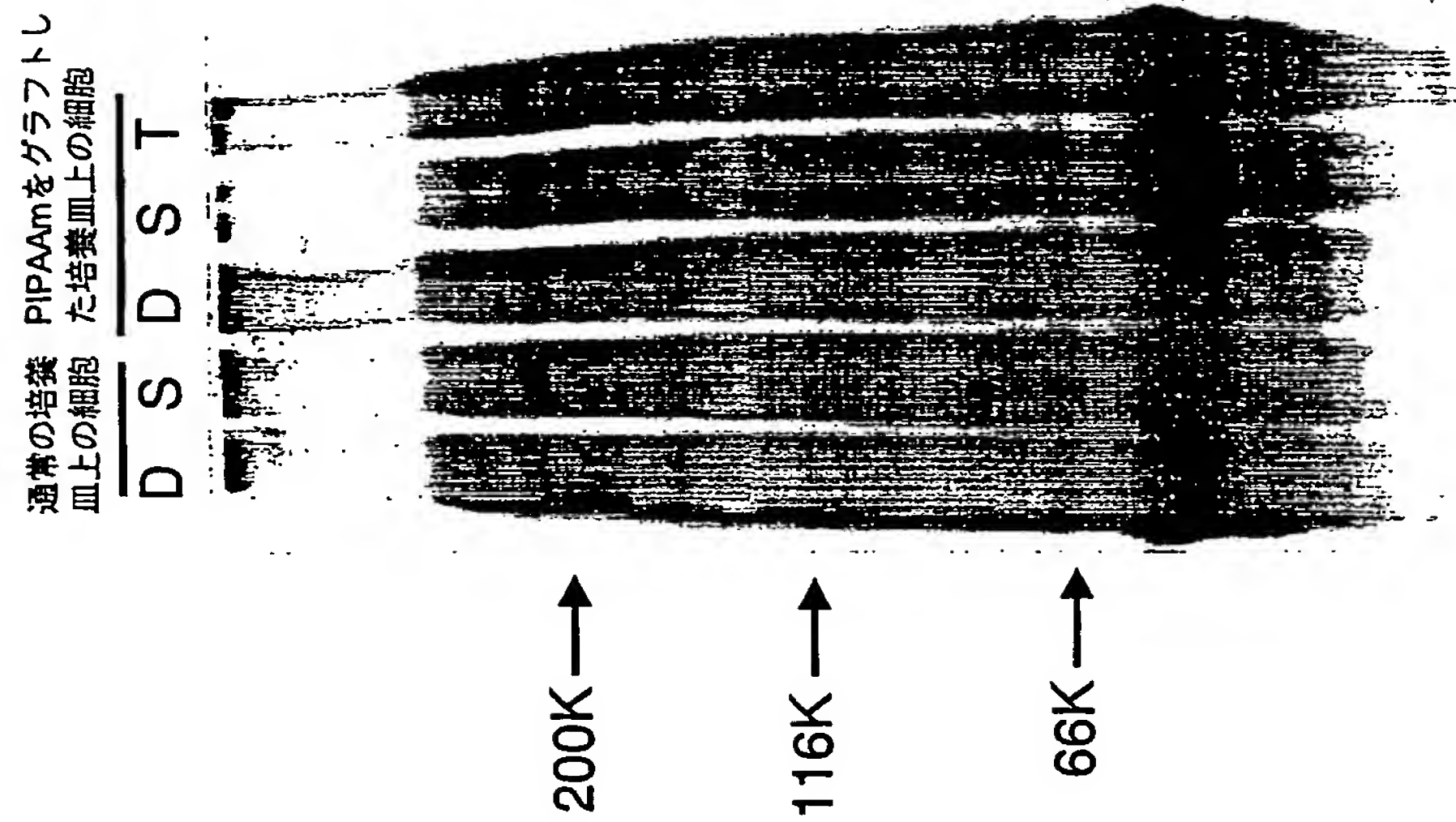


図4

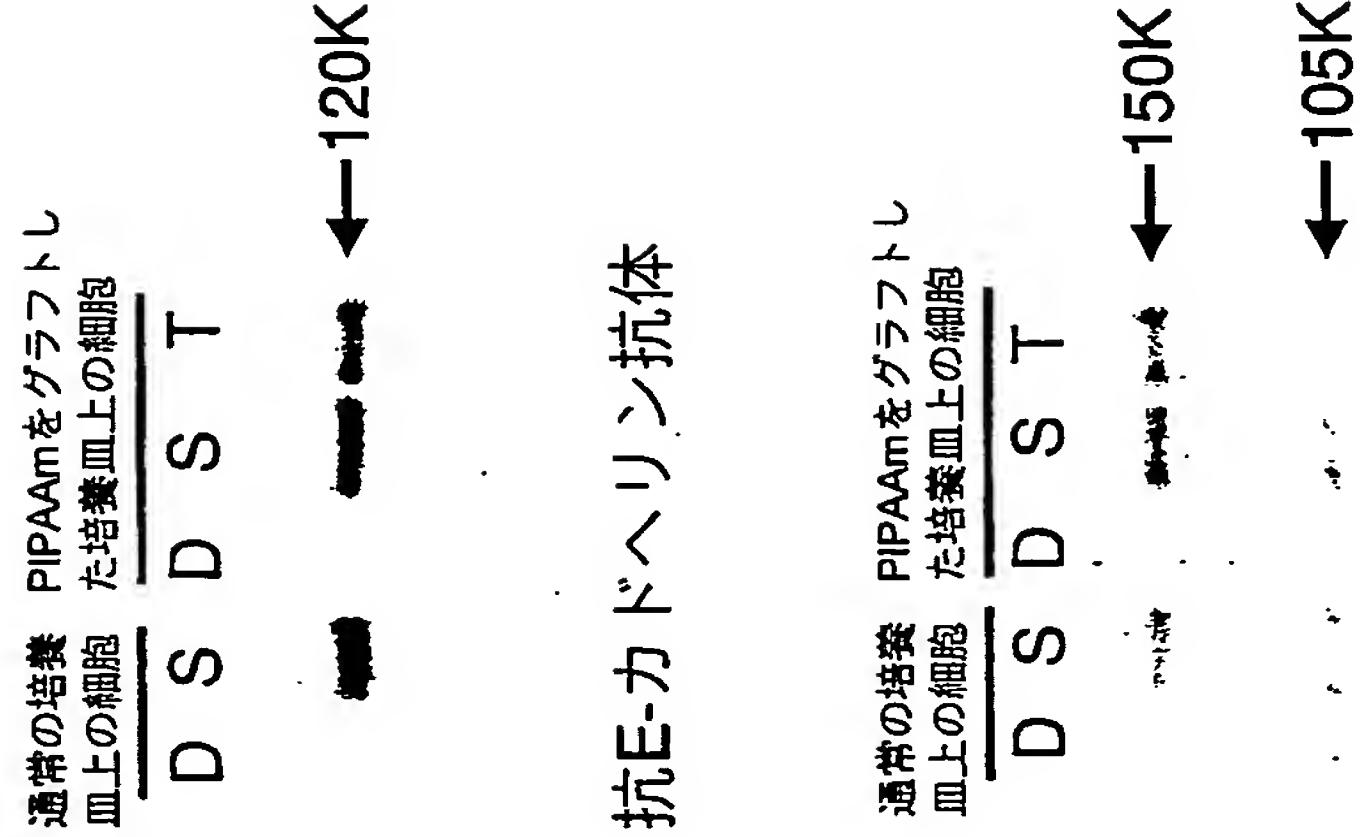
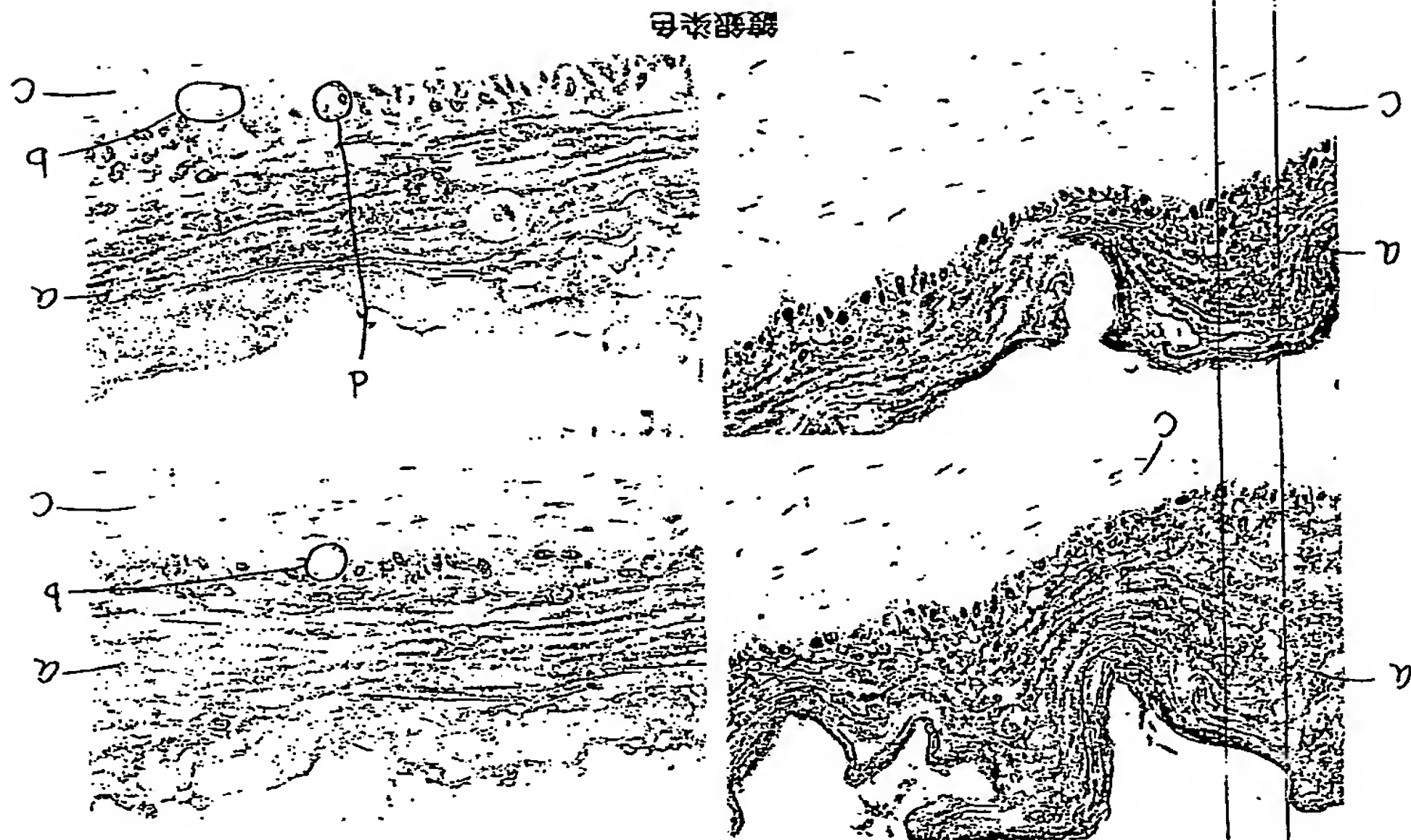


図5

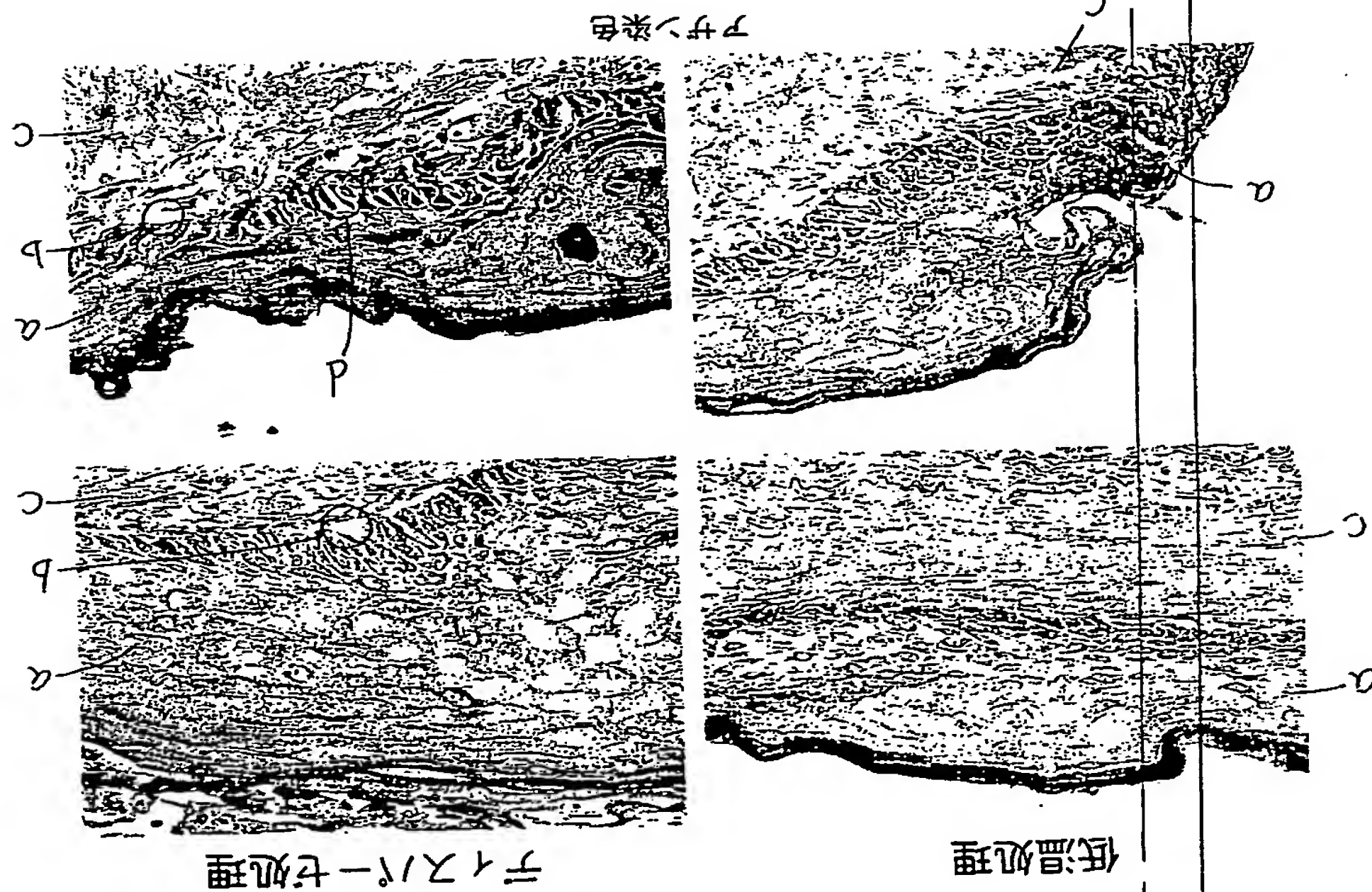


図 7



7/7

図 6



6/9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05723

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int. Cl.⁷ C12N5/06, 5/08, A61L27/38

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int. Cl.⁷ C12N5/06, 5/08, A61L27/38

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Yuuji SHIRAKATA et al., "Baiyou Hifu no Aratana Tenkai, Sanjigen Baiyou Hifu no Sakusei", Soshiki Baiyou Kougaku, 25 March, 1999, Vol.25, No.3, pages 109 to 111, especially, page 110, right column, lines 27 to 30	1, 3 2
Y	Masayuki YAMATO et al., "Ondo Outou-sei Baiyo-sara kara Hi-shinshuu-toki ni Kaishuu shita Saibou Sheet no Seika-teki Kaiseki to Soshiki Kougaku e no Ouyou", Tokyo Joshi Ika Daigaku Sougou Kenkyusho Kiyou, (1998), Vol.19, pages 173 to 174, especially, page 173, lines 23 to 26	2, 4, 6, 7, 10, 11 5, 8
Y A	Akihiko KIKUCHI et al., "Two-dimensional manipulation of confluent cultured vascular endothelial cells using temperature-responsive poly(N-isopropylacrylamide)-grafted surfaces", Journal of Biomaterials Science Polymer Edition, (1998), Vol.9, No.12, pages 1331 to 1348, especially, Fig.1	4, 6, 7, 10, 11 5, 8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"G" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 September, 2001 (28.09.01)

Date of mailing of the international search report
16 October, 2000 (16.10.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05723

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Yuuji SHIRAKATA et al., "Baiyou Hifu no Rinshou Ouyou", Nippon Hifu-ka Gakkai Zasshi, 20 August, 1999, Vol.109, No.9, pages 1301 to 1307	1-11
A	JP 5-192138 A (Kao Corporation), 03 August, 1993 (03.08.93), (Family: none)	1-11
A	WO 81/01416 A1 (Massachusetts Institute of Technology), 28 May, 1981 (28.05.81), & EP 40240 A1 & JP 56-501601 A & US 4304866 A & CA 1159777 A	1-11

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05723

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 12 pertains to methods for treatment of the human body by therapy.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
- ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP01/05723	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl. ⁷ C12N5/06, 5/08, A61L27/38			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl. ⁷ C12N5/06, 5/08, A61L27/38			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に利用した用語)			
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)			
C. 関連すると認められる文献		関連する	
引用文献の カテゴリ *	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号	
X	白方裕司ほか、培養皮膚の新たな展開—三次元培養皮膚の作成、組織培養工学、25.3月.1999, 第25巻, 第3号, p.109-111	1.3	
Y	特に、p.110右欄第27-30行参照。	2	
Y	大和雅之ほか、温度応答性培養皿から非侵襲的に回収した細胞シート	2, 4, 6, 7, 10, 11	
A	の生化学的解析と組織工学への応用、東京女子医科大学総合研究所紀要、1998, 第19巻, p.173-174	5, 8	
特に、p.173第23-26行参照。			
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリ— 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に基礎を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、出願者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 28.09.01		国際調査報告の発送日 16.10.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JIP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 内田 俊 生 印	
		4B 8214	
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

BEST AVAILABLE COPY

国際調査報告		国際出版番号 PCT/JPO1/05723
第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き) 法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成できなかった。		
1. <input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲 1 2 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。 つまり、 請求の範囲 1 2 は、治療による人体の処置方法に該当する。		
2. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、		
3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。		
第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き) 次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときこの国際調査機関は認めた。		
1. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。		
2. <input type="checkbox"/> 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。		
3. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。		
4. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。		
追加調査手数料の異議の申立てに関する注意 <input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。 <input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。		
様式PCT/ISA/210 (第1ページの続表 (1)) (1998年7月)		

国際調査報告		国際出版番号 PCT/JPO1/05723
C (続き) 関連すると認められる文献	関連する請求の範囲の番号	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y A	KIKUCHI, Akihiko et al., Two-dimensional manipulation of confluent cultured vascular endothelial cells using temperature-responsive poly(<i>N</i> -isopropylacrylamide)-grafted surfaces, Journal of Biomaterials Science Polymer Edition, 1998, Volume 9, Number 12, pages 1331-1348 See especially Figure 1.	4, 6, 7, 10, 11 5, 8
A	白方裕司ほか、培養皮膚の臨床応用, 日本皮膚科学会雑誌, 20. 8月. 1999, 第109巻, 第9号, p. 1301-1307	1-11
A	JP 5-192138 A (花王株式会社) 3. 8月. 1993 (03. 08. 93) (ファミリーなし)	1-11
A	WO 81/01416 A1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 28. 5月. 1981 (28. 05. 81) & EP 40240 A1 & JP 56-501601 A & US 4304866 A & CA 1159777 A	1-11